家蚕先天免疫基因 *Bmimd* 的克隆、表达及序列分析

张雨丽，程廷才，许平震，黄璐琳，夏庆友*

（西南大学农业部蚕桑学重点实验室，重庆　400716）

摘要：昆虫的先天免疫应答由一组基因通过级联网络调控实现。果蝇 *Drosophila* 免疫缺陷（immune deficiency，imd）基因在体液免疫信号传递途径中起着重要的作用。我们利用生物信息学方法进行电子克隆，成功地找到了 *imd* 基因在家蚕 *Bombyx mori* 中的同源体，命名为 *Bmimd*。该基因全长 1 092 bp，由 4 个外显子和 3 个内含子组成，开放阅读框（open reading frame，ORF）长 750 bp，编码 250 个氨基酸，预测蛋白质分子量为 28.6 kD。Bmimd 序列中含有一个致死结构域，经聚类分析表明该结构域与哺乳动物的受体相互作用蛋白（receptor interacting protein，RIP）相似。将该基因亚克隆到 PET-50b 载体进行原核表达，表达出了带有 2 个 6×His tag 和 1 个 Nus·Tag 标签的重组蛋白。Western blotting 结果表明 Bmimd 蛋白在 5 龄 4 天家蚕的头、脂肪体、生殖腺、表皮和中肠中都有表达，但丝腺中没有检测到表达。

关键词：家蚕；*imd* 基因；克隆；表达；先天免疫

中图分类号：Q966；S881.2　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：0454-6296(2008)05-0459-07

Cloning，expression and sequence analysis of *Bmimd*，an innate immunity gene in the silkworm，*Bombyx mori*

ZHANG Yu-Li，CHENG Ting-Cai，XU Ping-Zhen，HUANG Lu-Lin，XIA Qing-You* (Key Sericultural Laboratory of Agricultural Ministry，Southwest University，Chongqing 400716，China)

Abstract：The cascade of innate immunity in organisms was regulated by a set of genes. The gene immune deficiency of *Drosophila* plays an important role in the pathway of humoral immunity. We got a homolog of *Drosophila imd* from *Bombyx mori* successfully through *silico* cloning，and named it *Bmimd*. The gene is 1 092 bp in length，consisting of 4 exons and 3 introns，containing an ORF of 750 bp，encoding a protein with 250 amino acids，and the predicted molecular weight is 28.6 kD. Bmimd contains a death-domain，which is similar to mammalian RIP by sequence analysis. Prokaryotic expression of the gene recombinant with six-His tag and a Nus·Tag was successfully carried out through sub-cloning into PET-50b vector. The result of Western blotting showed that the gene was expressed in head，fat body，germen，cuticle and midgut，but its expression was not detected in silk glands of the silkworm.

Key words：*Bombyx mori*；*imd*；cloning；expression；innate immunity

昆虫没有 B 和 T 淋巴细胞系统，因而不具有高等动物的适应性免疫系统。但是，昆虫的先天免疫系统却能够对微生物的感染作出快速有效的免疫应答，以抗菌肽、抗病毒因子、凝集素、溶菌酶及蛋白酶抑制剂等多种活性因子，配合多种功能的血细胞建立起一个开放完整的防御体系。此过程主要通过激活如 Toll 途径和 Imd 途径的一些信号转导途径，级联传递和放大感染信号，并将信号从细胞外传递到细胞内，最后合成效应分子，杀灭病原微生物。Toll 途径主要由革兰氏阳性细菌和真菌激活，并产生防卫素等抗菌肽；而 Imd 途径主要应答革兰氏阴性细菌的侵染，并控制抗革兰氏阴性细菌的抗菌肽基因（如 Diptericin）的表达（De Gregorio *et al*.，2002）。

Imd 途径是在研究果蝇 *Drosophila* 的一个隐性突变体 *imd*[1]（immune deficiency[1]，imd[1]）中的抗菌肽基因表达时发现的，它在果蝇的体液免疫中起着重要

基金项目：国家'973'计划项目（2005CB121000）；国家自然科学基金项目（30470991）；国家'863'计划项目（2006AA10A118）；高等学校博士点基金（20040625011）

作者简介：张雨丽，女，1982 年 11 月生，硕士研究生，研究方向为生物化学与分子生物学，E-mail：ZYL8324@126.com

* 通讯作者 Author for correspondence，E-mail：xiaqy@swu.edu.cn

收稿日期 Received：2007-10-05；接受日期 Accepted：2008-01-07

的作用(Lemaitre *et al*.,1995)。Imd 途径通过激活 Rel/nuclear factor(NF)-κB 样转录因子调节抗菌肽基因的表达。果蝇 *imd* 基因编码一个 30 kD 的蛋白,C-末端部分含有一个致死结构域,该结构域与鼠和人类 75 kD 的受体相互作用蛋白(receptor interacting proteins, RIPs)有较高的序列相似性(Stanger *et al*., 1995)。该致死结构域能与信号传递途径下游的 Fas 相关死亡结构域(Fas associated death domain, FADD)蛋白相互作用,形成配体-受体复合物(Leulier *et al*., 2002)。Imd 蛋白作用于遗传学定义的细胞内信号级联反应最顶部,该级联反应激活 Relish 转录因子(Corbo and Levine, 1996; Dushay *et al*., 1996; Ferrandon *et al*.,1998)。*Imd* 基因除了在免疫中起着重要作用外,还有证据表明它还参与细胞凋亡(Georgel *et al*., 2001)。

昆虫幼虫营腐生生活和生长发育,其成虫通常作为带菌者导致植物和动物疾病,而它自身却能有效地防御这些疾病,因此研究昆虫免疫防御机制是一项重要的工程。以黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* 为模式的昆虫免疫学研究起步较晚,许多研究都还处于初步阶段。昆虫体液免疫调控机制仅仅在果蝇中得到初步确立,在其他昆虫如冈比亚按蚊 *Anopheles gambiae* 中证实了信号传递途径中一些基因的功能,途径中的大多数基因及其功能尚处于推测阶段。家蚕 *Bombyx mori* 作为鳞翅目昆虫的代表,是继果蝇和按蚊之后第三个完成全基因组测序的模式昆虫。目前对家蚕体液免疫调控机制研究还比较少,至今未见有关家蚕 *imd* 基因的报道。我们根据已公布的果蝇 imd 蛋白序列、家蛋的表达序列标签(expressed sequence tags, ESTs)和基因组序列对家蚕先天免疫基因 *imd* 进行电子克隆及结构分析,并进一步以原核表达系统为载体,表达和纯化 Bmimd 蛋白,制备抗体,并研究了 Bmimd 蛋白在家蚕同一时期不同组织中的表达情况,为进一步研究 *imd* 在家蚕先天免疫中的功能及家蚕体液免疫传递途径提供参考和依据。

1 材料和方法

1.1 家蚕 *imd* 基因的序列分析

从美国国立生物技术信息中心 NCBI(http://www.ncbi.nlm.nih.gov)下载果蝇 *imd* 基因编码的氨基酸序列(NP_573394)。该序列与家蚕 EST 数据库进行 TBLASTN 检索,挑选满足条件的序列,用 DNAstar 软件进行序列拼接延伸,经迭代检索到不能延伸为止。预测基因的外显子、内含子结构采用 sim4 程序(Florea *et al*., 1998)。预测结构域采用 SMART 软件(http://smart.embl-heidelberg.de/smart/)。预测分子量、等电点在 Expasy 网站(http://ca.expasy.org/tools/)进行。

1.2 实验材料

实验材料是家蚕大造品种,由本实验室饲养。于 5 龄 4 天解剖分离其头、表皮、丝腺、中肠、脂肪体和生殖腺,液氮速冻后保存于 -80℃备用。

1.3 家蚕 *Bmimd* 基因的 TA 克隆及测序

用 Trizol(购自 Invitrogen)提取 RNA, M-MLV (Promega)反转录为 cDNA 第一链,并以此 cDNA 为模板进行 PCR 扩增。所有步骤均按试剂盒说明操作。引物序列为 F: 5′-gccggatccGGCCACTTTAAAAACAAAG-3′(下划线表示设计的 *Bam*H Ⅰ 酶切位点)和 R: 5′-cgcctcgagTTAGTTTTTTCAGAGTAC-3′(下划线表示设计的 *Xho* Ⅰ 酶切位点)。PCR 扩增条件为:先 95℃预变性 5 min,然后 94℃变性 40 s、54℃退火 50 s、72℃延伸 1 min,35 个循环,最后 72℃终循环 10 min。PCR 产物用 1%的琼脂糖凝胶电泳分离并回收纯化(鼎国胶回收试剂盒)。连接纯化的目的片段到 PMD18-T 载体(TaKaRa),连接产物转化至大肠杆菌 *Eschevichia coli* JM109。阳性克隆经酶切鉴定和测序验证,命名为 imd/PMD18-T。

1.4 重组表达载体的构建及融合蛋白的诱导表达

imd/PMD18-T 和 PET-50b(+)原核表达载体(Novagen 公司)经 *Bam*H Ⅰ 和 *Xho* Ⅰ 酶切后,切胶回收目的片段,然后将两目的片段连接并转化到克隆宿主菌大肠杆菌 JM109 中,筛选阳性克隆,测序验证无任何碱基突变后命名为 imd/PET-50b。再将 imd/PET-50b 质粒转化到 BL21(DE3)表达宿主菌,0.4 mmol/L 异丙基-1-硫代-β-D-半乳糖苷(IPTG)、37℃诱导 imd/PET-50b/BL-21 重组菌表达蛋白。采用常规 SDS-PAGE 电泳检测表达情况,浓缩胶浓度为 5%,分离胶浓度 12.5%,考马斯亮蓝 R-250 染色显示蛋白条带。

1.5 融合蛋白的纯化及抗体制备

大量诱导 imd/PET-50b/BL-21 重组表达菌,溶菌酶裂解细菌,按 Triton X-100 法提取和洗涤表达的包涵体蛋白后,经 SDS-PAGE 电泳分离、切取目的蛋白、电洗脱纯化获得目的蛋白。以该纯化的蛋白为抗原免疫健康的雄兔,初次免疫后加强免疫 3 次,经间接 ELISA 法测定抗体效价达 1:3 000 后采血,饱和

硫酸铵盐析法纯化抗体。

1.6　组织蛋白的提取和 Western blotting 检测

液氮碾磨所保存的家蚕各组织后，用 PBS 缓冲液溶解，12 000 r/min、4℃离心 30 min，分离上清和沉淀。上清为可溶蛋白，沉淀用裂解液(8 mol/L 尿素，2%CHAPS，4% DTT)溶解。所提蛋白测定浓度后，按等量上样进行 12.5% SDS-PAGE 分析，然后将目的蛋白电转移到 PVDF 膜上，用上述纯化的抗体杂交，二抗为 HRP 羊抗兔 IgG(美国 Sigma)，最后用 DAB 显色。

2　结果与分析

2.1　家蚕 *imd* 基因的电子克隆

使用 TBLASTN 程序将果蝇的 imd 氨基酸序列在家蚕的 EST 库里面进行同源性检索，检索得到一条同源性高的 EST 序列，再与家蚕基因组预测的基因库比较，检索到一条序列，编号为 Bmb012749。再以这两条序列为种子序列使用 BLASTN 程序去检索家蚕 EST 库，将检索到的 EST 序列再用 DNASTAR 进行电子延伸，重复检索、延伸步骤直到不能延伸为止。最后检索得到 6 条 EST 序列，将其延伸拼接得到一条长度为 1 092 bp 的重叠群(图 1)，命名为 *Bmimd* 基因。通过 cDNA 和基因组比对，*Bmimd* 基因由 4 个外显子和 3 个内含子组成，ORF 位于 342 ~ 1 092 之间，长度为 750 bp。比较各条 EST 序列，发现该基因有 7 个单核苷酸多肽性 (single nucleotide polymorphism，SNP)位点，其中位于 5′端非翻译区的有：83 位的 T-A，84 位的 T-C；位于编码区的有：517 位的 GAC-AAC(错义突变：N-D)，630 位的 ACT-ACC(同义突变：T-T)，684 位的 GGC-GGT(同义突变：G-G)，693 位的 TAT-TAC(同义突变：Y-Y)和 730 位的 GCC-GCT(同义突变：A-A)。

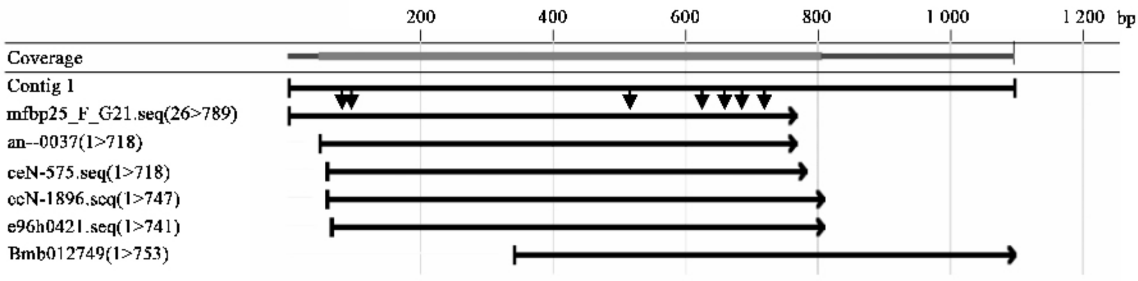

图 1　*Bmimd* 基因的 EST 组装示意图

Fig. 1　The schematic representation of EST assembly of *Bmimd*

短箭头示 SNP 位置。The position of SNP is marked with short arrowhead.

2.2　*Bmimd* 基因的克隆

以反转录所得 cDNA 为模板对 *Bmimd* 基因进行 PCR 扩增，在脂肪体中扩增效果最好，得到一条 750 bp 的目的片段，大小与预计的相符合(图 2：A)。将 PCR 扩增得到的 DNA 通过 1% 琼脂糖凝胶电泳分离，切取目的条带纯化回收后，连接并克隆到 PMD18-T 载体上。挑取阳性克隆经酶切鉴定，能切下一条 750 bp 的片段(图 2：B)，最后将其测序验证，结果该克隆 imd/PMD18-T 与预测一致。

2.3　序列分析

Bmimd 全长 1 092 bp，由 3 个内含子和 4 个外显子构成，编码 250 个氨基酸，预测分子量和等电点分别为 28.6 kD 和 6.45。在 SMART 网站进行在线结构域分析，发现 Bmimd 在第 152 到 246 个氨基酸之间含有一个致死结构域。通过 SignalP 在线查找(http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/)，*Bmimd* 编码的第 1 到 19 个氨基酸为信号肽(图 3)。

通过 NCBI 的 blast 程序进行在线蛋白质序列比对，家蚕 Bmimd 与 NCBI 上登录的拟果蝇 *Drosophila simulans* 的 imd(AAQ64725)、冈比亚按蚊 *A. gambiae* 的 imd(XM_557597)、黑腹果蝇 *D. melanogaster* 的 immune deficiency CG5576-PA(NP_573394)、斑马鱼 *Danio rerio* 的 RIP(ABH10823)、家鼠 *Mus musculus* 的 RIP(AAB60487)、人类 *Homo sapiens* 的 RIP(AAC50137)和赤拟谷盗 *Tribolium castaneum* 的 similar to CG5576-PA(XP_971829)的蛋白序列相似性分别是 29%，27%，27%，32%，30%，39% 和 24%。使用 Clustalx 对它们进行聚类分析表明 Bmimd C-末端的致死结构域与哺乳动物的致死结构域蛋白 RIP 相似(图 4)。

2.4　原核表达载体的构建及 Bmimd 蛋白的诱导表达

imd/PMD18-T 通过 *Xho* Ⅰ 和 *Bam*H Ⅰ 双酶切形成粘性末端，然后亚克隆到 PET-50b 原核表达载体，

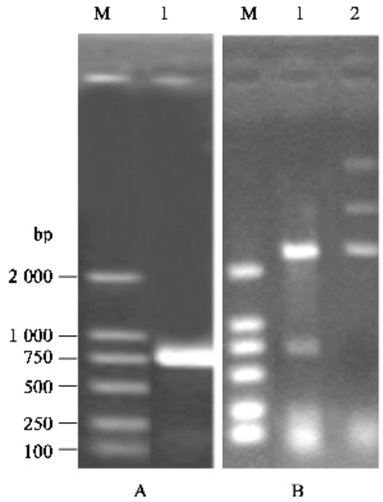

图 2 *Bmimd* 基因在脂肪体中的 PCR 扩增(A)和 imd/PMD18-T 酶切鉴定(B)结果

Fig. 2 Amplified fragment of *Bmimd* by PCR in fat body (A) and restriction enzyme digestion analysis of imd/PMD18-T (B)

M: DL-2000 Marker; 1: *Bmimd* 片段 The fragment of *Bmimd*; 2: imd/PMD18-T 质粒酶切 Plasmid of imd/PMD18-T digested by restriction endonuclease; 3: imd/PMD18-T 质粒 Plasmid of imd/PMD18-T.

转化到克隆宿主菌 JM109 中,经测序验证无任何碱基突变后确定为阳性克隆,命名为 imd/PET-50b。进一步将 imd/PET-50b 质粒转化到表达宿主菌 BL21(DE3),用 IPTG 于 37℃ 诱导 imd/PET-50b/BL-21 表达重组蛋白,得到一个约 97 kD 的融合蛋白,其中标签(含 2 个 6 × His tag 和 1 个 Nus·Tag)蛋白约 68 kD,目的蛋白约 29 kD,与预测分子量相符合。而没有诱导的 imd/PET-50b/BL-21 则几乎没有相应的特异条带,同样条件诱导的 PET-50b/BL-21 空载体菌得到约 68 kD 的标签蛋白(图 5)。

2.5 Western blotting 检测家蚕组织中 imd 蛋白的表达情况

采用 Bradford 法(Bradford, 1976)测定所提 5 龄 4 天家蚕头、表皮、丝腺、中肠、脂肪体和生殖腺中的总蛋白含量,然后等量上样,电泳检测各组织上清夜(可溶成分)和沉淀(不溶成分)蛋白。12.5% SDS-PAGE 电泳蛋白样品,上样量统一为 3.0 μg 总蛋白。目的蛋白 Bmimd 的预测分子量是约 29 kD,电泳完后切取 35 kD 和 19 kD 之间的胶进行电转膜和

```
TAGGGCATTCCTTAAGCTTTGGCAATGGATCTCAGACTGACAGAAATAAATACCACAGCACAACAAAAATAAATCTAAGTATTTAATAGTTT
CTTTTTTTGTGAAATTTTCTTAATATTCGTAGTTTTAATGTTGGTAACTTGAATTACCAGACTCTTATTTTATTATTTCTAAAAACATACCA
ATTTTTTGTGTGTTTGTTTAATCAATTAATGTTAAACGCTAAACGGATGTGATATATGAGTATGCTTTGATTATTTGTCTGTGAATGTGTGT
ACCATAAAACATTTACGACAACATTATCTCTTTGTTTGCATTAAGGAAATTTAAAATACAACAATGGCCACTTTAAAAACAAAGCTATCG
                                                                 M  A  T  L  K  T  K  L  S
GAATTTATCAAGGGTTTCAGAACTGATGCTGTGCCAAGACAGCCTCGACCAGTAAATGTTGACTTTGACCATCAAGTACCACCGGAAGCC
 E  F  I  K  G  F  R  T  D  A  V  P  R  Q  P  R  P  V  N  V  D  F  D  H  Q  V  P  P  E  A
CCGGTAGATGACGAACATGCAGACTCTAGTGAACACGAAGAAGTTATCATTGAGGAAGAAAACGATAGTGATATGAAGAAAAAATCCAAG
 P  V  D  D  E  H  A  D  S  S  E  H  E  E  V  I  I  E  E  E  N  D  S  D  M  K  K  K  S  K
CCTAAATCATTTTTCAAACCGAAAATACCGAAGAAATCTTCAAAGAAACCTGACCCTAACAACCATAAAGGCTCAATCAATACCCAAG|CT
 P  K  S  F  F  K  P  K  I  P  K  K  S  S  K  K  P  D  P  N  N  H  K  G  S  I  N  T  Q  A
GCAGGCAATGTATTGAATGTGGTTGGTTGTACAAACGTAAGATGGGGTAATGATTACTTTATGGGTACTACTTATATCGGATCAAAAAAT
 A  G  N  V  L  N  V  V  G  C  T  N  V  R  W  G  N  D  Y  F  M  G  T  T  Y  I  G  S  K  N
GCCAAGAAAGAAGAAACTTGTGATGATAGCGACCCAGAAGAGGAAATTGTAAAGACTGGTCTCATTAAAACTGTTATGAAAGCTACCATA
 A  K  K  E  E  T  C  D  D  S  D  P  E  E  E  I  V  K  T  G  L  I  K  T  V  M  K  A  T  I
AAG|CCGGAAGATGAGCATTTAGATTACATATCGAAGAATATGGGTAAAACATGGCGCAAGTTCTTCCGGAAACTCGGCTTCACCGAAGGC
 K   P  E  D  E  H  L  D  Y  I  S  K  N  M  G  K  T  W  R  K  F  F  R  K  L  G  F  T  E  G
AGAATTGATACATTTGAACACGACAATAAAATTTATGGTGTACAAGA|GGTTCGGTACAAGCTTCTTCTCGAATGGATGCAAAAGAAGAAT
 R  I  D  T  F  E  H  D  N  K  I  Y  G  V  Q  E   V  R  Y  K  L  L  L  E  W  M  Q  K  K  N
GATGCAACTCTCGGAAAACTCGCCACGTTGCTTTGGGAACACGGCGAAAAATGCGTCGTAAAGGAATTAGCAGATTTGTACTCTGAAAAA
 D  A  T  L  G  K  L  A  T  L  L  W  E  H  G  E  K  C  V  V  K  E  L  A  D  L  Y  S  E  K
AACTAA
 N  *
```

图 3 *Bmimd* 的 cDNA 序列及推导的氨基酸序列

Fig. 3 The cDNA sequences and deduced amino acid sequences of *Bmimd* in silkworm

箭头表示引物位置,竖线位置为内含子位置,双下划线部分表示为致死结构域位置,虚线部分为信号肽位置。

Primer-binding regions are marked with arrowhead. The exon boarders are indicated by vertical bar. The death domain site is double-underlined, and the site of signal peptide is marked with dash.

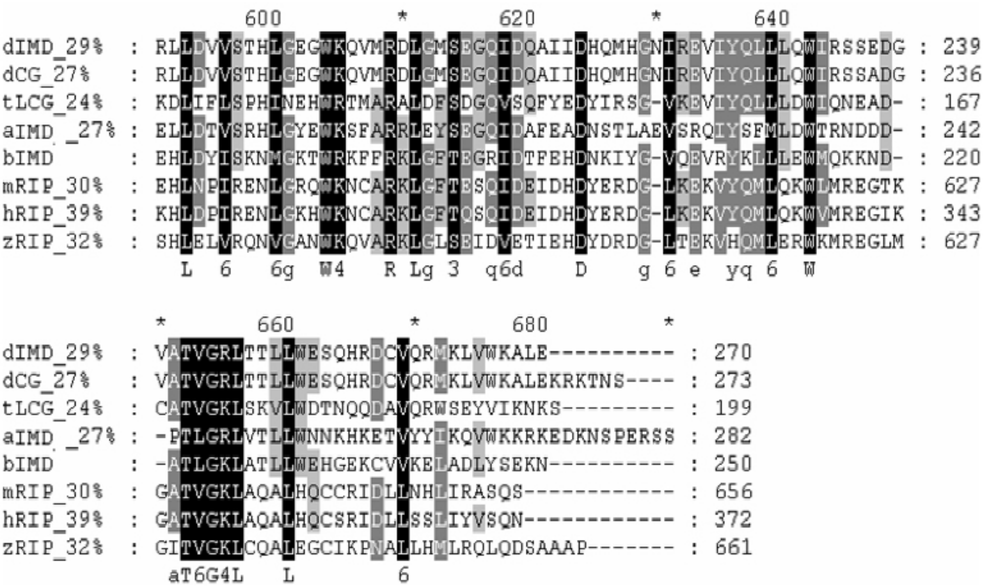

图 4　imd 与人、鼠、斑马鱼 RIP 的氨基酸序列比对

Fig. 4　Sequence alignment of imd and RIP of human，mouse and zebrafish

dIMD：拟果蝇 *Drosophila simulans* imd；dCG：黑腹果蝇 *D. melanogaster* immune deficiency CG5576-PA；tLCG：赤拟谷盗 *Tribolium castaneum* Similar to CG5576-PA；aIMD：冈比亚按蚊 *Anopheles gambiae* imd；IMD：家蚕 *Bombyx mori* imd；mRIP：家鼠 *Mus musculus* RIP；hRIP：人类 *Homo sapiens* RIP；zRIP：斑马鱼 *Danio rerio* receptor-interacting protein.

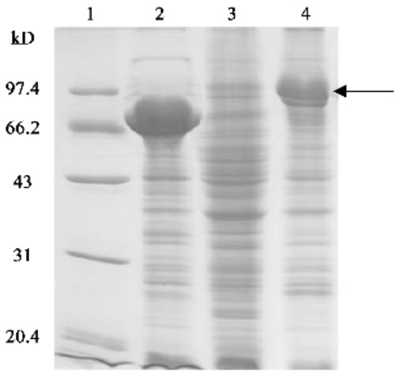

图 5　imd/PET-50b/BL-21 诱导表达蛋白

Fig. 5　The expressed protein of imd/PET-50b/BL-21

1：蛋白质分子量标准 Protein molecular weight marker（low）；2：PET-50b/BL-21 空载体诱导 Induced PET-50b/BL-21；3：imd/PET-50b/BL-21 没有诱导 Non-induced of imd/PET-50b/BL-21；4：imd/PET-50b/BL-21 诱导 Induced imd/PET-50b/BL-21. 箭头所指处为目的蛋白 The arrow indicates target protein.

Western blotting 杂交（图 6：A，B）。其中，Bmimd 都存在于组织蛋白可溶部分，不溶部分没有检测到杂交信号。Bmimd 蛋白在头、脂肪体、生殖腺和表皮中都有表达，中肠中也有很微弱的表达，而丝腺中没有检测到表达。

3　讨论

先天免疫传递途径中的 Toll 途径在昆虫和哺乳动物体内均存在，因此，研究先天免疫的先驱者们都认为昆虫先天免疫是由 Toll 信号传递途径介导抗菌肽的表达实现的。后来发现，*imd* 突变体对革兰式阴性细菌易感，但与 Toll 突变体相比，则能更有效地抵御革兰氏阳性菌和真菌的侵染。这一现象引起了研究者的重视，对其进行深入研究发现了昆虫先天免疫的另一条信号传递途径：Imd 途径。Imd 途径就是以 *imd* 基因命名的。Imd 途径由革兰氏阴性菌激活，介导产生的抗菌肽（如天蚕素、果蝇肽等）抗革兰氏阴性菌。虽然在哺乳动物中至今没有发现 Imd 途径，但研究表明 Imd 途径与哺乳动物肿瘤坏死因子受体（tumour-necrosis factor receptors，TNFRs）信号传递途径相似，因为这两条途径的各组成成分在结构和功能上都很相似（Hoffmann and Reichhart，2002）。

据目前推测，Imd 通路是按如下方式进行传递的：跨膜识别蛋白识别入侵的病原微生物（革兰氏阴性细菌）后，与之结合，形成病原-识别蛋白复合物，此时识别蛋白被活化。活化的识别蛋白胞内结构域直接结合 imd，使 imd 活化，感染信号由此从细胞外传递到细胞内。该信号继而通过转录生长因子 β 激酶 1（transforming growth factor-β-activated kinase 1，TAK1）传递给 NF-κB 激酶抑制物复合物。最后，该信号导致转录因子 Relish 被复合物磷酸化或被 Dredd（一种含致死结构域的果蝇胱天蛋白酶）与

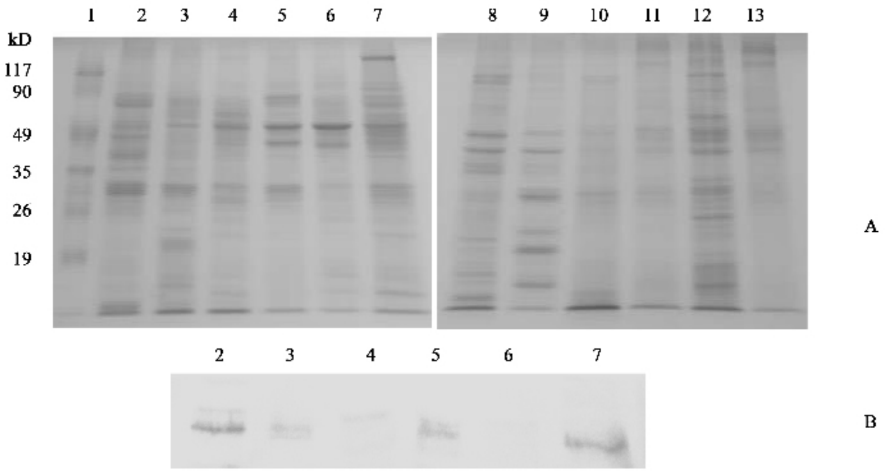

图 6 家蚕各组织总蛋白 SDS-PAGE(A)和 Western blotting 杂交结果(B)

Fig.6 Result of Bmimd protein by SDS-PAGE (A) and Western blotting (B) in different tissues

1:预染蛋白质分子量标准 Prestained protein molecular weight marker;2:头上清 Supernatant of head;3:表皮上清 Supernatant of cuticle;4:中肠上清 Supernatant of midgut;5:脂肪体上清 Supernatant of fat body;6:丝腺上清 Supernatant of silk gland;7:生殖腺上清 Supernatant of germen;8:头沉淀 Deposit of head;9:表皮沉淀 Deposit of cuticle;10:中肠沉淀 Deposit of midgut;11:脂肪体沉淀 Deposit of fat body;12:丝腺沉淀 Deposit of silk gland;13:生殖腺沉淀 Deposit of germen.

FADD 形成的复合物水解而激活。被激活了的 Relish 转运到细胞核内,并与 DNA 结合,启动抗菌肽基因的转录(Gesellchen *et al*.,2005)。

但是 Imd 途径的组成分子仅有很少部分被定义,因为进行上位分析很困难,而且大多数组成成分在亚细胞定位方面缺乏数据(Lemaitre and Hoffmann,2007),所以还有许多研究有待于开展和深入。*Imd* 基因是该信号途径中的关键基因,对该基因功能的研究具有重要意义。果蝇 *imd* 隐性突变体的存在,为对该基因的研究提供了便利。但由于 *imd* 基因在各物种中的同源性较低,对它的广泛研究比较困难,所以在除果蝇和按蚊的其他物种中几乎没有关于该基因的研究报道。

本研究首次电子克隆得到家蚕 *imd* 基因,基因全长 1 092 bp,ORF 长 750 bp,编码 250 个氨基酸,由 4 个外显子和 3 个内含子构成。比较各 EST 证据,发现该基因有 7 个 SNP 位点,但只有一个由谷氨酸突变为谷氨酰胺的错义突变外,其他几个均为同义突变。同源性分析发现家蚕 *imd* 与果蝇、按蚊和赤拟谷盗同名基因间的氨基酸相似性分别只有 29%,27%和 24%,说明 *imd* 基因在各个物种之间的同源性较低。通过预测得到 Bmimd 与果蝇的 imd 蛋白一样,具有一个致死结构域。该结构域与斑马鱼和哺乳动物的 RIP 相似。RIP 是与肿瘤坏死因子受体和 Fas 相互作用的蛋白,它们的相互作用激活 NF-κB 转录因子。与 TNFR 信号途径的 RIP 作用相似,Imd 能够作用于上游的受体-配体复合物(Devin *et al*.,2000;Poyet *et al*.,2000;Zhang *et al*.,2000)。Bmimd 的致死结构域与受体 RIP 相似,暗示 Bmimd 可能是家蚕先天免疫信号传递途径中的一种配体,并推测 Bmimd 蛋白也能够直接与该途径中上游的病原-跨膜识别蛋白复合物发生作用,将刺激信号从细胞外传递到细胞内。

随着基因工程技术的发展,利用原核表达载体获得大量外源蛋白,是科研和生产中简便而廉价的方法。本研究中采用 PET-50b 为载体,表达的融合蛋白约 98 kD,去除标签蛋白后的目的蛋白约 29 kD,与预测分子量 28.6 kD 相符合,并且与果蝇 *imd* 基因编码一个 30 kD 蛋白的报道相一致。Imd 途径不仅参与全身性体液免疫,还参与了局部免疫。当有活的微生物造成家蚕轻微损伤时,其天蚕素在表皮下边的上皮细胞中被诱导转录,这种诱导局部抗菌肽基因的表达,由革兰氏阴性菌自然感染机体激发,并由 Imd 途径介导产生(Tzou *et al*.,2000;Önfelt Tingvall *et al*.,2001);而且有报道说 *imd* 参与细胞凋亡(Georgel *et al*.,2001)。我们还在 mRNA 水平调查过 *Bmimd* 在 5 龄 4 天家蚕各组织中的表达情况,实验结果表明各组织中都有表达(未发表数据),所以推测 Bmimd 蛋白可能在各个组织中也都有表达。Western blotting 检测家蚕组织中 imd 蛋白的表达情况,表明 Bmimd 蛋白在 5 龄 4 天的家蚕头、脂肪体、生殖腺和表皮中都有表达,中肠中也有很微弱的

表达，但丝腺中没有检测到表达，可能是因为 5 龄 4 天的家蚕丝腺细胞的活动已主要集中在合成丝蛋白上，其他功能的基因表达量已降低或不再表达。

目前我们还不了解家蚕先天免疫信号传递途径中的基因之间是如何作用的。*imd* 基因的克隆和分析，原核表达得到该基因表达的蛋白质，能为进一步在家蚕中研究其功能、与其他基因间的相互作用和家蚕先天免疫研究提供一定极有价值的线索。

参 考 文 献（References）

Bradford MM，1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilzing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*，72：248 – 254.

Corbo JC，Levine M，1996. Characterization of an immuno-deficiency mutant in *Drosophila*. *Mech. Dev.*，55：211 – 220.

Devin A，Cook A，Lin Y，Rodriguez Y，Kelliher M，Liu Z，2000. The distinct roles of TRAF2 and RIP in IKK activation by TNF-R1：TRAF2 recruits IKK to TNF-R1 while RIP mediates IKK activation. *Immunity*，12：419 – 429.

De Gregorio E，Spellman PT，Tzou P，Rubin GM，Lemaitre B，2002. The Toll and Imd pathways are the major regulators of the immune response in *Drosophlia*. *EMBO J.*，21(11)：2 568 – 2 597.

Dushay MS，Asling B，Hultmark D，1996. Origins of immunity：Relish，a compound Rel-like gene in the antibacterial defense of *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*，93：10 343 – 10 347.

Ferrandon D，Jung AC，Criqui M，Lemaitre B，Uttenweiler-Joseph S，Michaut L，Reichhart J，Hoffmann JA，1998. A drosomycin-GFP reporter transgene reveals a local immune response in *Drosophila* that is not dependent on the Toll pathway. *EMBO J.*，17：1 217 – 1 227.

Florea L，Hartzell G，Zhang Z，Rubin GM，Miller W，1998. A computer program for aligning a cDNA sequence with a genomic DNA sequence. *Genome Res.*，8(9)：967 – 974.

Georgel P，Naitza S，Kappler C，Ferrandon D，Zachary D，Swimmer C，Kopczynski C，Duyk G，Reichhart JM，Hoffmann JA，2001. *Drosophila* immune deficiency（IMD）is a death domain protein that activates antibacterial defense and can promote apoptosis. *Dev. Cell*，10(1)：503 – 514.

Gesellchen V，Kuttenkeuler D，Steckel M，Pelte N，Boutros M，2005. An RNA interference screen identifies *Inhibitor of Apoptosis Protein* 2 as a regulator of innate immune signaling in *Drosophila*. *EMBO Rep.*，6(10)：979 – 984.

Hoffmann JA，Reichhart JM，2002. *Drosophila* innate immunity：an evolutionary perspective. *Nat. Immunol.*，3：121 – 126.

Lemaitre B，Hoffmann J，2007. The host defense of *Drosophila melanogaster*. *Ann. Rev. Immunol.*，25：697 – 743.

Lemaitre B，Kromer-Metzger E，Michaut L，Nicolas E，Meister M，Georgel P，Reichhart JM，Hoffmann JA，1995. A recessive mutation，immune deficiency（imd），defines two distinct control pathways in the *Drosophila* host defense. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*，92：9 465 – 9 469.

Leulier F，Vidal S，Saigo K，Ueda R，Lemaitre B，2002. Inducible expression of double-stranded RNA reveals a role for dFADD in the regulation of the antibacterial response in *Drosophila* adults. *Curr. Biol.*，12：996 – 1 000.

Önfelt Tingvall T，Roos E，Engström Y，2001. The *imd* gene is required for local *Cecropin* expression in *Drosophila* barrier epithelia. *EMBO Rep.*，2(3)：239 – 243.

Poyet JL，Srinivasula SM，Lin JH，Fernandes-Alnemri T，Yamaoka S，Tsichlis PN，Alnemri ES，2000. Activation of the IκB kinases by RIP via IKKγ/NEMO-mediated oligomerization. *J. Biol. Chem.*，275：37 966 – 37 977.

Stanger BZ，Leder P，Lee TH，Kim E，Seed B，1995. RIP：a novel protein containing a death domain that interacts with Fas/APO-1（CD95）in yeast and causes cell death. *Cell*，81：513 – 523.

Tzou P，Ohresser S，Ferrandon D，Capovilla M，Reichhart JM，2000. Tissue-specific inducible expression of antimicrobial peptide genes in *Drosophila* surface epithelia. *Immunity*，13：737 – 748.

Zhang SQ，Kovalenko A，Cantarella G，Wallach D，2000. Recruitment of the IKK signalosome to the p55 TNF receptor：RIP and A20 bind to NEMO（IKKγ）upon receptor stimulation. *Immunity*，12：301 – 311.

（责任编辑：赵利辉）